

(25)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-12724

⑬ Int.Cl.⁴
A 61 K 45/02

識別記号 庁内整理番号
ABJ 7252-4C
ADD

⑭ 公開 昭和62年(1987)1月21日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑮ 発明の名称 IFN- γ 含有医薬組成物

⑯ 特 願 昭61-123862

⑰ 出 願 昭61(1986)5月30日

優先権主張 ⑱ 1985年5月30日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3519361.1

⑳ 発 明 者 マインラット ベテル オーストリア国ウィーン、ベルガツセ 25-28
リツク

㉑ 発 明 者 オスカー ホフマン オーストリア国ウィーン、フツヘンガツセ17-19-41
㉒ 出 願 人 ベーリンガー インゲルハイム インターナ ドイツ連邦共和国インゲルハイム アム ライン(番地なし)
ショナルゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテルハフツング

㉓ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名

明細書の内容は(内容に変更なし)
明 細 書

1. 発明の名称

IFN- γ 含有医薬組成物

2. 特許請求の範囲

- (1) 骨の生成および分解に際して生じる過程を調節する IFN- γ 含有医薬組成物
- (2) 炎症または非炎症起原(実性疾患)の全身のまたは局所的骨疾患治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (3) 病理学的骨吸収の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (4) 骨組織の局所的または全身的分解によつて生じる骨疾患治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (5) 骨吸収の増大を招く過程を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (6) 骨におけるプロスタグランジンの内因性合成を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (7) 骨におけるプロスタグランジンの合成にほ

んどまたは全く阻害作用を示さない非ステロイド性抗炎症剤と配合した、プロスタグランジンの内因性合成および骨軟化病を阻害する特許請求の範囲第1項および第2項のいずれかに記載の医薬組成物

(8) 破骨細胞活性を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

(9) パラソルモンによつて生じるすべての骨異常症、とくに腎性の骨疾患の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

(10) パラソルモン誘発骨吸収の抑制と、自己免疫応答によつて生じる糸球体腎炎の場合同時に免疫抑制活性による、進行性腎不全の付加的治療剤としての特許請求の範囲第1項から第9項までのいずれかに記載の医薬組成物

(11) すべての型および段階の骨代謝症治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

(12) IFN- γ 単独またはジリン酸塩と配合したパージェット病治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

03 リウマチ型の疾患、とくに慢性関節リウマチ（一次性慢性多関節炎）の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

04 骨喪失が増大する病および諸疾患の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

05 プロスタグランジン合成阻害（慢性疼痛）における過カルシウム血症の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

06 骨疾患の治療に特に活性を示す化合物を配合した特許請求の範囲第1項から第15項までのいずれかに記載の医薬組成物

3. 発明の詳細な説明

生きている骨組織は一定の再形成過程をくり返して、生理的条件下には新形成と分解が平衡を維持している。骨化骨の新形成（骨生成）は主として骨芽細胞の活性によつて決定される。これらの骨芽細胞の機能は、有機骨マトリックスの調整の成分——主としてアミノコラーゲン——の合成と分泌であつて、これはついでヒドロキシルアパタイトの沈着によつて骨化される。骨化骨の分解

高齢者にみられるが、この喪失が年齢から考えられるよりはるかに大きいものである。骨粗鬆症はもつとも高度の骨の骨疾患と考えられる。

とくに閉経後の婦人にこの疾患が多い。たとえば本國における調査では65歳を超えた全女性の25%はこの疾患に罹患しているという(5)。調査に計及して、西ドイツでは患者は約300~400万人と考えられる。骨喪失の結果、骨柱、大腿骨頭部または肢部、すなわちとくに大きな応力がかかるやすい身体部位の骨折が増大する。これらの骨折は重症で、運動制限や障害が残ることが多い。代表的な変化は骨柱の彎曲である。これは患者の運動能を著しく障害する。常に痛みがあるのに加えて、屈曲した姿勢は、心肺および背腸管にも悪影響を与える。

この疾患には、カルシウムレベル、およびカルシウムレベルしたがつて骨の骨化や有機骨マトリックスの新形成をも調節する各種ホルモンがとくに関与している。閉経後の婦人で低下するエストロジンはとくに重要である。

は、多分、単球（マクロファージ）から細胞融着によつて形成される多核巨大細胞のような破骨細胞によつて行われる(1)。

骨芽細胞と破骨細胞の活性は、生成過程と分解過程の間の動的平衡を維持する複雑な調節機構により、生理的条件下にはたがいに釣り合っている。調節はホルモン類、1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃、パラソルモンおよび（多分）カルシトニン(2)によつて行われるのみでなく、各種の局所メデイエーターおよび組織ホルモン(3)、とくにプロスタグランジン(4)やまだ同定されていない“カププリング因子”(5)によつても行われている。最近挙げた因子は、破骨細胞活性刺激因子に骨芽細胞の反応増大反応がみられ、これがたとえば分解の増大が骨形成の増加によつて補償される結果と考えられるということによって支持されているものである。この平衡の異常が多くの骨疾患の原因となる。とくにそのひとつとして骨粗鬆症を挙げることができる。これは骨喪失、すなわち骨質密度と有機骨マトリックスの喪失を主とするもので、主として

各ホルモンおよびメデイエーターの特定の活性に關しては、パラソルモンおよびビタミンD₃、とくにその代謝物で骨強で形成される1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃が一時的に骨芽細胞の活性を阻害することが確立されている(6)。さらに、これらは、単球破骨細胞の融合を促進し、したがつて骨組織における破骨細胞数を増加させるように思われる(7)。それらの活性に対する直接的な影響も否定できない。プロスタグランジンも別の機構によつて、破骨細胞の数および活性の増加をもたらすとされている(8)。

最近になつて、インターロイキンおよびリンフォカインがまた、骨再形成過程に特異的な役割を果たしていることが明らかにされた(9)。マクロファージの免疫応答の骨組織内で形成されるインターロイキン1は癌細胞において骨の分解を促進する(10)、その活性の一部は骨吸収活性を有するプロスタグランジンの内因性合成を刺激することによると考えられる(11)。いわゆる“破骨細胞活性化因子”(OAF)は、インターロイキン1を含めた各

腫瘍細胞に対する阻害としてγ-リンパ球によつて産生されるリンフォカインである。OAFはまた、プロスタグランジンによつて付与される骨軟化作用を有する。

骨粗鬆症の治療は、現在では、骨密度の喪失を抑制することが事実上不可能なので難しい。フルオライドによる再吸収については論争がある。したがつて、治療の方向は、骨の分解過程を骨形成の速度まで低下させ、疾患の進行を阻止することに向けられている。

しかしながら、疾患の予防も必要である。木山では、女性に食物からカルシウムを十分摂取前からさせ、排泄するように指導されている。

しばらく前から、ペプチドホルモンであるカルシトニンも、骨分解を阻害できるといわれてきた。よく、破骨細胞に対するパラソルモンの作用を阻害するが、またそれ自身、破骨細胞に対する抑制作用をもつように思われる。しかしながら、カルシトニンによる治療は少なく、骨の喪失がすでにかなり進行している患者にのみ推奨されて

を活性化できる(上記文献参照)。

γ-インターフェロンは、破骨細胞によつてもたらされる骨軟化症の分解を促進することが期待されていたのである。したがつて、骨軟化症に対する阻害作用は、全く驚くべきことである。

本発明は、骨形成および分解の過程に生じる過程に対する調節作用をもつさまざまな成分の製造のためのγ-IFNの利用に関する。

本発明は、病理的な骨喪失を導く過程を、驚くべきことにIFN-γが阻害できることをはじめて開示するものである。これは、プロスタグランジンシンターゼ複合体(シクロオキシゲナーゼ系)とγ-インターフェロンの相互作用により、骨における骨軟化活性プロスタグランジン類の内因性合成を一次的に抑制することにより達成される。カルシトニンにはこの作用はない。

骨におけるプロスタグランジンの合成の阻害には、驚くべきことに、IFN-γに特異的な作用である。このような作用はIFN-βにもγにもない。カルシトニンに類似の第二の作用(7)に、パラソルモ

ンによつて阻害される破骨細胞活性の阻害がある。しかしながら、このIFN-γの作用は骨密度の場合にのみ認められる。このカルシトニン様活性は、JilkaとHamiltonがたとえば、ヒト白血球インターフェロンが破骨細胞においてPTH-誘発骨吸収を阻害できることを明らかにしていること(9)から、他の型のインターフェロンにも同様に認められるものであらうと思われる。

本発明は、驚くべきことに、γ-インターフェロンが、骨形成および分解の過程に生じる過程に対してきわめて強力な調節作用を有することを発見し、完成されたものである。

免疫インターフェロンとも呼ばれるγ-インターフェロン(IFN-γ)は、インターロイキン1と同様、リンパ球が予め感作された抗原によつて特異的にまたは非特異的に刺激されたのち、リンパ球上に生成されるので、1種のリンフォカインとみなすことができる。ヒト白血球の培養液中でIFN-γは多核巨噬細胞(polymorphonuclear)の生成を促進するので、IFN-γは破骨細胞中球の融合を促進できるものと推測された。さらに、IFN-γは、それ自体、骨軟化症を誘発するマクロファージ

ンによつて誘発される破骨細胞活性の阻害がある。しかしながら、このIFN-γの作用は骨密度の場合にのみ認められる。このカルシトニン様活性は、JilkaとHamiltonがたとえば、ヒト白血球インターフェロンが破骨細胞においてPTH-誘発骨吸収を阻害できることを明らかにしていること(9)から、他の型のインターフェロンにも同様に認められるものであらうと思われる。

γ-インターフェロンによるプロスタグランジン合成の阻害は、これまでインターフェロンはプロスタグランジンの合成を刺激しようとする方が考えられたことから、全く驚くべきことである。たとえば、γおよびδ-インターフェロンによる治療中に起こる発熱は、視床下部におけるPGE₂濃度の上昇に由来するとされている(10)ことなどがあ

る。この骨軟化に対するγ-インターフェロンの驚くべき作用は、骨のシクロオキシゲナーゼ系に対する特異性によつて説明されるものと見られる。プロスタグランジンシンターゼ複合体の組成特

異性の産については古くから知られている。骨では、この酵素複合体は IFN- β や IFN- γ では感作を受けないようである。すでに得られている結果（たとえば 4）とは別に、上述の Jilka と Hamilton の研究で、I 型インターフェロンは破骨吸収に何ら影響を与えなかつたという事実によつても、これが示されているように思われる。酵素複合体の感受性の差を示す他の例は、C-243 細胞からのマウスインターフェロンがマウスでの局所性骨移植に与える影響を検討した Nilsson らの実験にも認められる。使用したインターフェロンが骨あるいは関節下部のプロスタグランジン合成を刺激したとしたら期待されるような、このインターフェロンによる骨軟化症の所見は得られていない。

本発明の他の目的は、病理学的変化した局所性または全臓性の骨分解によつて生じる疾患、たとえばすべての骨および関節における骨粗鬆症の治療のための活性物質として γ -インターフェロンを含有する医薬組成物の使用にある。

症に多くの症例で良い効果を示しているということを思い起こせば、骨粗鬆症の治療にとても有利であろうと思われる。しかしながら、すでに述べたように、カルシトニンは PO の合成に作用せず、その活性の強弱は異なるものである。

これらの差から、各症例ごとに、2つの物質のいずれが有利に使用されるか、また両者とも使用できるかを決定できる可能性が生じる。

IFN- γ によるプロスタグランジン合成の驚くべき阻害は、骨再構築過程において、IFN- γ がインターロイキン 1 や破骨細胞活性化因子 (OAF) の対抗物であることを示している。この性質は、その合成が各種の炎症メディエーターにより、リウマチ型疾患とくに慢性関節リウマチや類似の疾患において少なからず OAF によつて刺激されているプロスタグランジンの骨軟化症が、これらの疾患において認められる関節の破壊に寄与していることから、治療的にきわめて重要である。したがって、本発明は、本発明の薬剤のリウマチ型の疾患とくに慢性関節リウマチへの使用をも包含する、

老人性骨粗鬆症の原因および発病に関してはほとんどわかっていないが、分解過程の比較的優越が骨実質の病理学的希薄化を招くという考え方が広く受け入れられている。骨粗鬆症の患者が、骨吸収ホルモン PTH や 1, 25-ジヒドロキシ D₃ の血清レベルに何ら異常を示していないという事実は驚くべきことである。したがって、骨分解速度の増大は一次的に局所性因子の影響に由来するものと推測される。これを支持するものとしては、老人性骨粗鬆症の患者の骨生検で、正常人よりも高い POE₂ 活性を認めたという Aikawa らの研究がある。Pujil らは、骨粗鬆症の患者で T-ヘルパーリンパ球と T-サブレッサーリンパ球の比が変化していることを見出し、骨粗鬆症には免疫調節の障害の可能性があると結論した。これは、免疫調節因子であるインターロイキン 1 や上述の破骨細胞活性化因子が PO 合成の刺激物質である点で重要である。骨における PO 合成に対する IFN- γ の驚くべき阻害作用は、IFN- γ がカルシトニンと同様に骨吸収に影響し、このホルモンが実は骨粗

IFN- γ による治療は、非ステロイド性の消炎剤（たとえばインドメタシン）による相当する治療に比べてきわめて有利である。それは患者が世の組織においても（たとえば胃粘膜においても）同時に PO 合成の阻害作用を示すために重篤な副作用（急性潰瘍）を生じるからである。しかしながら、多くの非ステロイド性消炎剤は PO の合成に対してわずかな阻害作用を示すのみであり、これらは、 γ -IFN の骨における PO 合成に対する選択的作用により γ -IFN と有利に配合できることが証明できる。いずれにしても、インターフェロン治療が一次性慢性多関節炎（慢性関節リウマチ）の退治に何による効果を示すかを判定することは難しい。この疾患では各種の自己免疫現象が認められ、IFN- γ の免疫調節作用がそのどれに効果を示すかは十分研究されていないからである。使用する用途により、IFN- γ は B-リンパ球による免疫グロブリンの産生に抑制作用と刺激作用の両者を示す。各種免疫疾患において、患者の血清にインターフェロンが増加していることも事実であ

か、しかしながら、これらの IFN 活性は IFN- γ よりむしろ IFN- α の変化に拘すべきものと思われる。細胞によつて与えられる免疫に関しては、一般に IFN- γ は T-リンパ球の増殖に対する抑制作用を示し、細胞性免疫の現象たとえば移植における拒絶反応または遅延型の過敏反応は抑制し、これらは ECP の治療には有利であろうと思われる。一方、IFN- γ はある種の条件下には細胞の免疫応答を刺激することもある。

すでに知られている腫瘍生育の抑制能に加えて、骨におけるプロスタグランジン合成の IFN- γ による抑制能は、腫瘍自体がプロスタグランジンを産生し、骨におけるプロスタグランジン合成を刺激するので、骨への転移や骨の分解の原因となる腫瘍の治療にはいずれにしても有利であろうと思われる。

骨の形成および分解の過程に起こる過程に対して明らかにされた γ -インターフェロンの効果は、骨形成の阻害や骨吸収の増大によつて生じると考えられる炎症性または非炎症性起源（炎症疾患）

その他の炎症性疾患による付加的活性を有するので、カルシトニンまたは他の骨疾患治療用として知られている他の薬剤と配合することも可能である。

本発明の薬剤は、たとえば、若年者にもしばしば見られ、一般には歯槽膿瘍とも呼ばれている歯槽の骨吸収のような、骨喪失が進む病および骨疾患の治療にもきわめて適している。

本発明の薬剤は、ヒト患者または動物に全身的にまたは局所的に、たとえば関節内に投与できるが、一般的には、注射、局所、非注射およびパッカル投与される。理論的には、 γ -インターフェロンの血漿／組織レベルの増大をもたらしすべての組織の投与が適している。たとえば、 γ -IFN の投与には溶液が便利であるが、他の剤型とすることも可能である。

本発明による利用には、減くべきことに、少量の γ -IFN でも十分である。投与量および用量比は、現在、臨床試験で γ -IFN に適用されている量と同様である。投与量は投与部位によつて変動する。

投与量は、 γ -インターフェロンの血漿／組織

の全身性または局所性骨疾患の治療に使用される医薬組成物のきわめて活性な物質として γ -インターフェロンを位置づけることになつたのである。

これらの疾患には、すでに述べたもののほか、パラソルモンによつて生じる各種の骨代謝異常、とくに骨性の骨疾患が含まれる。進行性骨不全においてパラソルモンによつて生じる骨吸収が知られている。これらの疾患の中には、自己免疫系によつて起こる糸球体腎炎がある。とくにこれらの症例には、 γ -IFN は免疫抑制作用をもつ治療活性物質として、とくに適している。本発明の物質は、骨吸収を阻害し、自己免疫反応に効果的に影響を与える。

同様に、他の骨代謝異常、パージエット病も、本発明の薬剤で治療できる。

さらに、 γ -IFN は、カルシトニン治療過程で応答がなかった症例および／または免疫反応を生じた症例すべてに適用できるといふ利点がある。

本発明の薬剤、 γ -IFN はすでに述べたように、

レベルの効果的な上昇を達成できるように選ぶべきことが必要となる。

本発明の薬剤は、慣用の医薬用試形剤および／またはビークルおよび／または安定化剤を含有させることができる。

使用できる安定化剤の例としては、アミノ酸、ジ-、トリおよびテトラペプチド、脂肪酸またはアルブミンを挙げることができる。

本発明の技術分野における熟練者には、多くの試形剤、ビークルおよび安定化剤がよく知られたところであろうし、また、本発明の薬剤をそれらといかに処方するかも熟知するところであろう。これらに関しては、E. W. Martin 著の Remington's Pharmaceutical Sciences の初頁および処方の記載を参照されたい。

次に、本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、これは本発明を例示するためのものであつて、いかなる意味でも本発明を限定するものではない。モデルで得られた結果は、すべての哺乳動物に移しかえることができる。

装置および方法

出典えマウス IPN-7 (大腸菌より) (Ernst Boehringer Institute für Arzneimittelforschung, Vienna) の比活性は 1 ㎖あたり 1.3×10^7 炭ウイルス単位であつた。IPN-7 は RPMI メジウムに溶解し、使用時まで高圧に低温での凍結状態に保存した。IPN-α および β (ニューキャッスル炭ウイルスで誘発し、テオフィリンで重誘発した Ehrlich 腹水細胞より) は Endo Biochem. Inc. 社 (N. Y.) の製品であつた (Ernst Boehringer Institute für Arzneimittelforschung)。パツナ 3-07001 の比活性は 4.4×10^6 0/㎖ 蛋白質であつた。使用した培養液の活性は 60.000 単位/㎖と測定された。比較の目的で使用した合成サケ-カルシトニン (比活性 100 MRC 単位/㎖) は Sanabo 社 (Vienna) の製品であつた。パラソモンは Bache社 (Torrance, California) の合成 N 末断断片 1-34 を使用した。プロスタグランジン E₂ は Upjohn 社の prostin E2 という名称の製品を使用した。ウシトロネピンは Hoffman

性化した 15 多ウマ血清を加えた。ウマ血清 (Gibco) は 65℃で 45 分間不活性化した。完全メジウムを旋回漏斗 (0.22 ミクロン, Millipore) を通した濾過した。

24 時間後に、培養メジウムを各種添加物とともに換え、ついで計 72 時間までまたは最高 96 時間まで培養を続けた。

骨吸収の程度はメジウム中へのカルシウムの放出を測定して定量した。この目的で、培養メジウム中のカルシウム濃度を、Corning 940 カルシウム分析装置で蛍光測定法を用い、時間 0, 24, 48, 72 または 96 に測定した。

結果は 6 個の頭蓋骨での平均±平均の標準誤差で示す。各群間の有意差は student の t-検定で求め、 $p < 0.05$ をもつて有意とした。

例 1

基礎骨吸収に対する IPN-7 の影響

メジウムに何も添加物を加えないで骨を培養しても、メジウム中のカルシウム濃度はわずかに増加し、これから骨はたえず吸収されていることが

LaRoche 社の topostasin を、またインドメタシンは Sharp & Dohme 社の製品をそれぞれ使用した。

マウス新生仔の頭蓋骨は、培養培養でかなり長期間 (96 時間までまたはそれ以上) 保持できる。実験法の詳細については多くの研究者が報告している (8, 12, 13)。使用した特定のマウスは、4-6 日齢の SPF マウスであつた (Institute für Versuchstierzucht of Vienna University, Himerberg)。この種は、HIM: OP と表示する。

頭蓋骨は滅菌条件下に調製する (ラミナールフロー)、付着した結合組織を圧着深く除去したのち、骨を試験管中 1.0 ㎖の培養メジウム (下記参照) 内に移す。50 多 O₂, 45 多 N₂ および 5 多 CO₂ で処理したのち、試験管を密封し、ついで培養培養の全期間を通じ、回転ドラム中 (回転速度: 20 回転/時)、37℃でインキュベートする。

培養メジウムは、MA Bioproducts 社 (Walkersville, Md) 製のダルベッコ改良イーグルメジウム (DMEM) とした。このメジウムに L-グルタミン酸を 1.4 多の濃度に加え、また加熱して不活

化する (第 1 図参照)。この理由はプロスタグランジンの内因性生成にある (14, 15)。事実、この基礎吸収は、第 1 図から明らかなように、プロスタグランジン合成の強力な阻害剤であるインドメタシンによつて抑制することができる。

培養メジウムに 100 U/㎖の濃度の IPN-7 を加えても、カルシトニンの阻害作用の程度に相当し、またインドメタシンの抑制効果に匹敵する基礎吸収の阻害が認められる (第 1 図)。結果を第 1 表にまとめる。

第1表

メジウム中の Ca^{++} , mmol/l
(5回の有の平均 ± 標準偏差)

	24h	48h	72h
未加物			
非処置	1.90 ± 0.06	2.02 ± 0.07	1.86 ± 0.09
ect (salmon calcitonin) (20 u/ml)	1.64 ± 0.02	1.70 ± 0.02	1.65 ± 0.03
Indomethacin (5×10^{-7} M)	1.63 ± 0.01	1.61 ± 0.02	1.55 ± 0.06
IPN-7 (100 u/ml)	1.80 ± 0.05	1.64 ± 0.02	1.52 ± 0.04

れる。トロンビンの活性の正確な機構はわかっていないが、その蛋白質分解活性(多分、他のプロテアーゼの活性化)により、膜ホスホリペドからアラキドン酸を切り出すホスホリパーゼを活性化できることによると推測されている。その結果、シクロオキシゲナーゼ系の基質がたえず供給されることになり、各種プロスタグランジンの内因性合成がたえず刺激されやすい。第2表および第2図は、IPN-7がトロンビン誘発骨吸収を完全に抑制することを示している。免疫インターフェロンの作用は、インドメタシン 5×10^{-7} M の作用効に全く匹敵するものである。

72時間値は、用量-活性曲線の挿入図の作成に使用した。

第2表

トロンビン誘発骨吸収に対する IPN-7 の効果

まず、本発明者らは、培養骨中の内因性プロスタグランジン生成に IPN-7 が阻害を示すかどうかを明らかにすることを試みた。そのために次の試験方法を開発した。すなわち、培養メジウムにトロンビンを加えると、インドメタシンによつて阻害される骨吸収が增強し時、トロンビンは明らかに内因性 PO 合成を刺激するという説明に由来し、72時間の培養時間中におけるマウス頭蓋骨の吸収に対する種々の濃度のトロンビンの影響を検討した。第2表と第8図から明らかのように、培養メジウム1mlあたり14~42単位の範囲のトロンビン濃度でカルシウムのメジウム中への最高放出が起こり、トロンビンによる吸収過程の刺激の程度は各試験間で比較的わずかな変動を示すのみでなく、各試験の比較で測定されたカルシウム放出の絶対値には高い再現性があることがわかった。したがって、この試験は骨における PO 合成の阻害剤の影響をみるのによく通じていると考えら

第2表

トロンビン	バイオアッセー	メジウム中の Ca^{++} , mmol/l (5回の有の平均 ± 標準偏差)		
		24h	48h	72h
未加物				
非処置		1.66 ± 0.03	1.63 ± 0.07	1.61 ± 0.07
Thrombin	1 u/ml	1.67 ± 0.03	1.81 ± 0.09	2.01 ± 0.31
Thrombin	7 u/ml	1.81 ± 0.06	2.30 ± 0.11	3.02 ± 0.55
Thrombin	14 u/ml	2.13 ± 0.08	2.66 ± 0.11	3.56 ± 0.21
Thrombin	21 u/ml	2.21 ± 0.03	2.69 ± 0.05	3.63 ± 0.11
Thrombin	28 u/ml	2.28 ± 0.02	2.71 ± 0.06	3.61 ± 0.12
Thrombin	42 u/ml	2.30 ± 0.05	2.72 ± 0.10	3.52 ± 0.12

第3表

添加物	メジウム中 Ca^{++} , mmol/l (5 皿の骨の平均±標準偏差)		
	24h	48h	72h
非処理	1.72 ± 0.03	1.71 ± 0.02	1.63 ± 0.04
IPN-7 (100 U/ml)	1.60 ± 0.01	1.59 ± 0.02	1.52 ± 0.04
PUE_2 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$)	2.04 ± 0.03	2.60 ± 0.05	3.60 ± 0.13
POE_2 ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) + IPN-7 (100 U/ml)	1.95 ± 0.04	2.40 ± 0.01	3.10 ± 0.06
Thrombin (14 U/ml)	2.11 ± 0.07	2.62 ± 0.05	3.62 ± 0.06
Thrombin (14 U/ml) + IPN-7 (100 U/ml)	1.99 ± 0.03	2.01 ± 0.04	1.92 ± 0.06
Arachidonic acid ($5 \times 10^{-3} \text{M}$)	1.92 ± 0.05	2.35 ± 0.10	2.85 ± 0.27
Arachidonic acid ($5 \times 10^{-3} \text{M}$) + IPN-7 (100 U/ml)	1.92 ± 0.09	2.01 ± 0.03	1.93 ± 0.03

骨形成促進も、またアラキドン酸誘導体骨形成促進も同様な影響を与えな5ことを見出すべきである (第3図、第4図、第4表、第5表参照)。

第5

PO シンターゼ複合体に対する IPN-7 の影響

まず、本発明者らは、IPN-7 がトロンボン誘発性の他のプロテアーゼもしくはホスホリパーゼの活性化に影響するかどうか、または免疫インターフェロンが直接プロスタグランジンシンターゼ複合体と相互作用するかどうかを確立することを試みた。この目的で、培養中のプロスタグランジン合成を培養メジウムへのアラキドン酸添加によつて刺激した。この脂誘導は前述のように、シクロオキシゲナーゼ反応により様々なプロスタグランジンに変換される。その骨軟化活性 (第2図) から、培養液中でもプロスタグランジンの合成に内因性アラキドン酸が使われることは明らかである。IPN-7 は、アラキドン酸によつて刺激された脂質培養液中での骨吸収を完全に阻害できる (第2図)。これらの結果は、IPN-7 が骨中のプロスタグランジンシンターゼ複合体に直接作用できることを示している。

これに関連して、カルシトニンはトロンボン誘

第4表

メジウム中 Ca^{++} , mmol/l
(5 皿の骨の平均±標準偏差)

添加物	メジウム中 Ca^{++} , mmol/l (5 皿の骨の平均±標準偏差)		
	24h	48h	72h
非処理	1.74 ± 0.04	1.72 ± 0.05	1.64 ± 0.08
Thrombin (14 U/ml)	2.11 ± 0.07	2.62 ± 0.05	3.62 ± 0.06
Thrombin + scv (20 mU/ml)	1.82 ± 0.01	2.08 ± 0.08	2.82 ± 0.19
Thrombin (14 U/ml) + IPN-7 (100 U/ml)	1.93 ± 0.03	2.01 ± 0.04	1.92 ± 0.06

表 5 次

メジウム中 Ca^{++} , mmol/l
(5 回の計の平均 ± 標準偏差)

添加物	24h	48h	72h
非処置	1.78 ± 0.05	2.01 ± 0.04	1.85 ± 0.06
AA ($5 \times 10^{-5} \text{M}$)	1.95 ± 0.05	2.41 ± 0.11	2.96 ± 0.28
AA ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) + Oct (20mU/ml)	1.72 ± 0.02	2.15 ± 0.05	2.78 ± 0.20
Oct (20mU/ml)	1.64 ± 0.02	2.18 ± 0.06	1.65 ± 0.05

する作用のほかに、PTH 誘発骨吸収に対しカルシトニン様作用を示すことが明らかにされた。サケカルシトニン 20 mU/ml の PTH 活性に対する作用も比較のために示す。

表 4

POE₂ および PTH によつて刺激された吸収に対する IPN-r の影響

IPN-r がプロスタグランジンの合成を抑制することが確立されたので、培養メジウム中に加えた POE₂ の骨軟化活性に対する IPN-r の影響は強いものであらうと予測された。実際、第 2 図に示すように、IPN-r は POE₂ の骨軟化活性にはわずかな影響を与えるのみであつた。しかしながら、この阻害作用は、内因性プロスタグランジン合成によつてもたらされる基礎骨吸収の相当する抑制より大きかつたことは注目される。プロスタグランジン合成の阻害に加えて、IPN-r がプロスタグランジンの一貫した作用に影響しないかをみるための検討を行つた。これらの作用にはとくに破骨細胞の活性化が言われる(8)。

パラソルモンも、プロスタグランジンとは独立の機構で、細胞培養時に破骨細胞の数をよび活性を増大させる(7)。実験結果を表 5 次および表 6 次

表 6 次

メジウム中 Ca^{++} , mmol/l
(5 回の計の平均 ± 標準偏差)

添加物	24h	48h	72h	96h
非処置	1.85 ± 0.02	2.04 ± 0.04	2.06 ± 0.06	2.03 ± 0.06
IPN-r (500 U/ml)	1.89 ± 0.03	1.89 ± 0.04	1.84 ± 0.03	1.78 ± 0.05
PTH (10^{-8}M)	2.08 ± 0.05	2.75 ± 0.07	3.87 ± 0.06	4.51 ± 0.16
PTH (10^{-8}M) + IPN-r (100U/ml)	2.07 ± 0.02	2.55 ± 0.06	3.49 ± 0.11	3.82 ± 0.17
PTH (10^{-8}M) + IPN-r (250U/ml)	2.05 ± 0.04	2.39 ± 0.07	3.12 ± 0.16	3.40 ± 0.25
PTH (10^{-8}M) + IPN-r (500U/ml)	2.08 ± 0.05	2.36 ± 0.01	2.97 ± 0.05	3.19 ± 0.09
PTH (10^{-8}M) + Oct (20mU/ml)	1.65 ± 0.01	2.15 ± 0.05	2.45 ± 0.10	2.52 ± 0.15

例 5

基礎および刺激因子に対する IPN- α , β の影響
 プロスタグランジン合成に対する作用がとくに
 IPN- γ に特異的なものか、または他の型のインター
 フェロンにも認められるものかを確立するため
 に、一連の試験を α , β -インターフェロン
 (IPN- α , β) についても反復して実施した。第 6
 図に示すように、この型のインターフェロンは、
 IPN- γ とは異なり、トロンビンまたはアラキドン
 酸誘発骨吸収に対し、みるべき阻害を示さない。
 用いた濃度 (100 U / ml) では、PTH
 誘発骨吸収に対する IPN- α , β の阻害も認められ
 なかった (第 7 図)。結果は以下の 2 表に示す。

第 8 表

メジウム中 Ca^{45} , nmol/l
 (5 匹の骨の平均値 \pm 標準偏差)

処置	24h	48h	72h	96h
非処置	1.85 \pm 0.03	2.02 \pm 0.04	2.09 \pm 0.08	2.01 \pm 0.08
IPN α/β (100 U/ml)	1.88 \pm 0.08	2.02 \pm 0.10	1.98 \pm 0.12	1.92 \pm 0.12
PTH (10 $^{-8}$ M)	2.04 \pm 0.04	2.78 \pm 0.09	3.91 \pm 0.22	4.42 \pm 0.39
PTH (10 $^{-8}$ M) + IPN α/β (100 U/ml)	1.97 \pm 0.06	2.64 \pm 0.11	3.62 \pm 0.23	4.14 \pm 0.27

第 7 表

メジウム中 Ca^{45} , nmol/l
 (5 匹の骨の平均値 \pm 標準偏差)

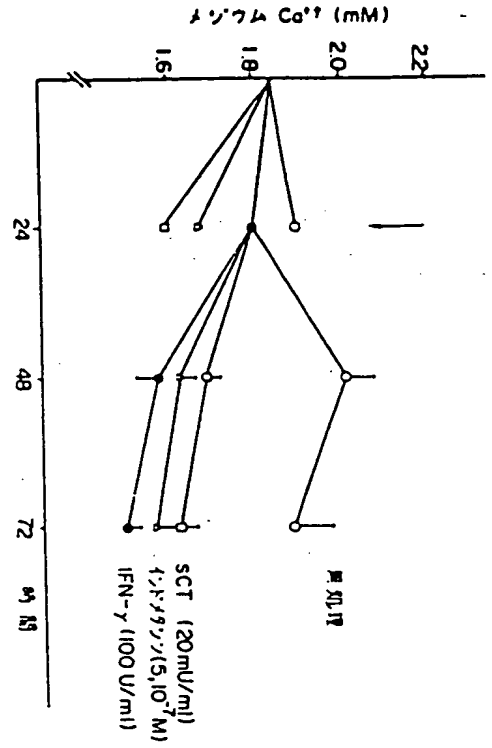
処置	24h	48h	72h	96h
非処置	1.85 \pm 0.03	2.02 \pm 0.04	2.09 \pm 0.08	2.01 \pm 0.08
IPN α/β (100 U/ml)	1.88 \pm 0.08	2.02 \pm 0.10	1.98 \pm 0.12	1.92 \pm 0.12
POE $_2$ (5 \times 10 $^{-7}$ M)	1.98 \pm 0.05	2.44 \pm 0.08	3.13 \pm 0.19	3.91 \pm 0.25
POE $_2$ (5 \times 10 $^{-7}$ M) + IPN α/β (100 U/ml)	1.96 \pm 0.05	2.38 \pm 0.06	2.96 \pm 0.11	3.49 \pm 0.16
Thrombin (14 U/ml)	2.08 \pm 0.04	2.50 \pm 0.01	3.20 \pm 0.06	3.81 \pm 0.08
Thrombin (14 U/ml) + IPN α/β (100 U/ml)	2.04 \pm 0.02	2.36 \pm 0.02	2.89 \pm 0.07	3.31 \pm 0.13
AA (5 \times 10 $^{-7}$ M)	2.07 \pm 0.03	2.50 \pm 0.08	3.15 \pm 0.16	3.39 \pm 0.27
AA (5 \times 10 $^{-7}$ M) + IPN α/β (100 U/ml)	2.03 \pm 0.04	2.46 \pm 0.07	2.84 \pm 0.11	2.89 \pm 0.22

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、マウス新生仔頭蓋骨からのカルシウム放出 (基礎骨吸収) に対する IPN- γ の影響を示す。第 2 図は、POE $_2$ 、トロンビンまたはアラキドン酸 (AA) によつて刺激された骨吸収に対する IPN- γ の影響を示す。第 3 図は、培養マウス新生仔頭蓋骨のトロンビン誘発骨吸収に対するサケカルシトニン (SCT) の影響を示す。第 4 図は、アラキドン酸 (AA) 誘発骨吸収に対するサケカルシトニン (SCT) の影響を示す。第 5 図は、培養マウス頭蓋骨のバラソルモン (PTH) 誘発骨吸収に対する IPN- γ のカルシトニン様作用を示す。第 6 図は、培養マウス新生仔頭蓋骨の骨吸収に対する IPN- α , β の影響を示す。第 7 図は、培養マウス新生仔の頭蓋骨におけるバラソルモン (PTH) 誘発骨吸収に対する IPN- α , β の影響を示す。第 8 図はトロンビン、バイオアッセーで、トロンビン誘発骨吸収の時間経過と阻害剤作用を示している。
 ○、対照；●、1 U / ml；△、7 U / ml；□、14 U / ml；挿入図は培養 72 時間後の、培養マウス

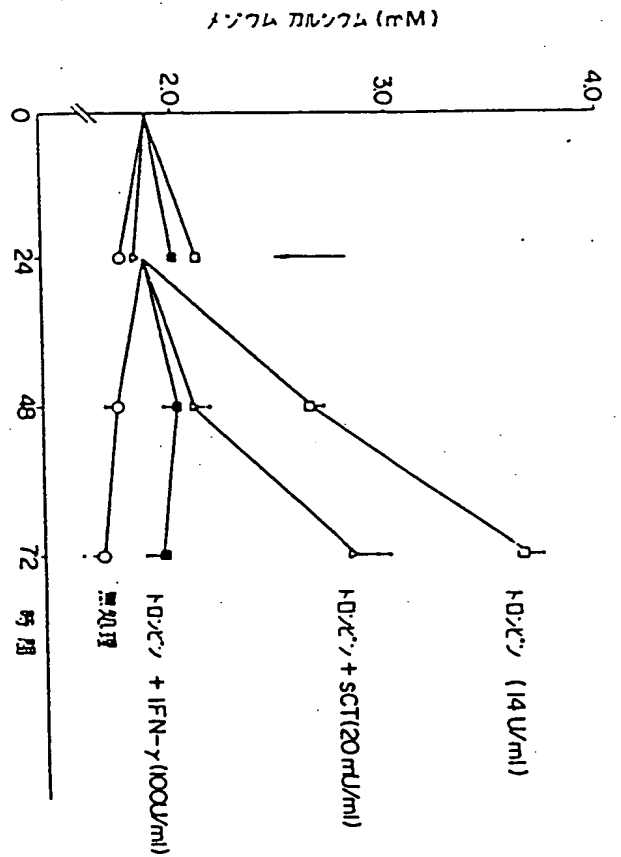
ジウムへのカルシウム放出で測定した、トロンビ
ン0.42U/mlの用量-反応曲線である。

第1図

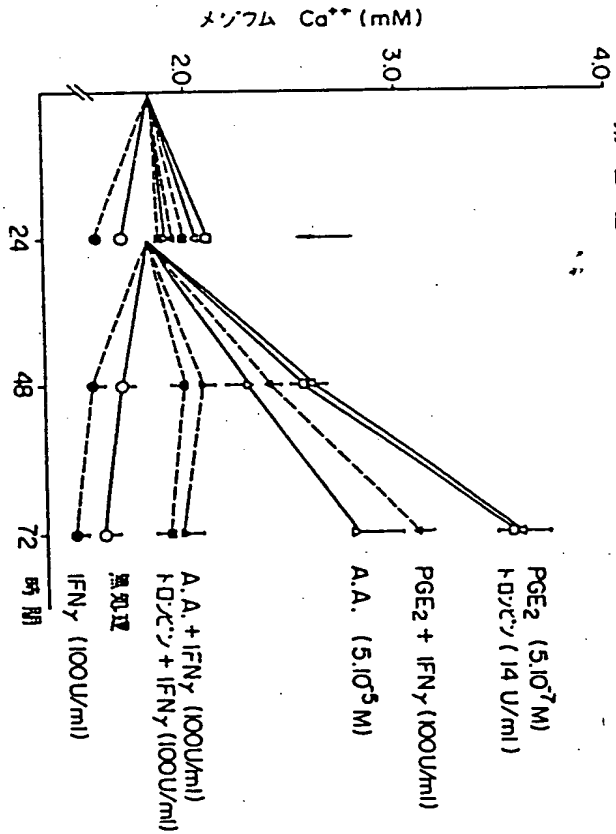


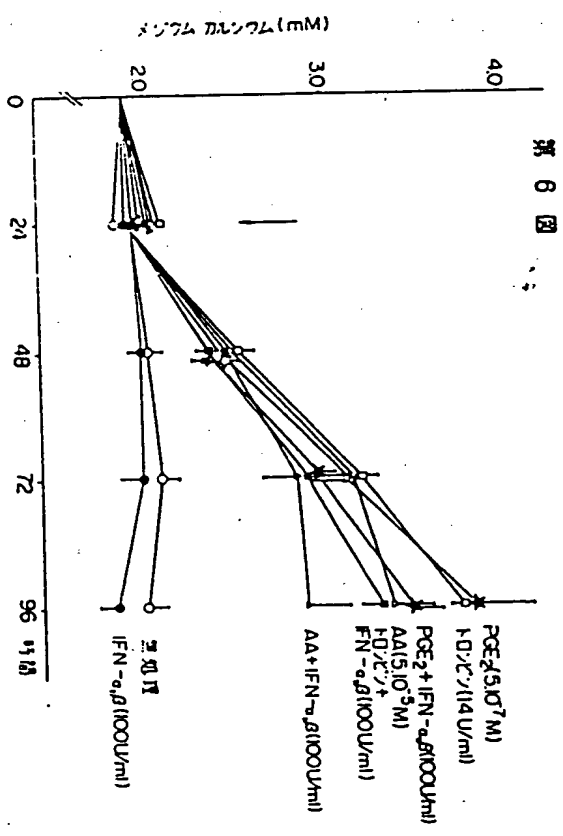
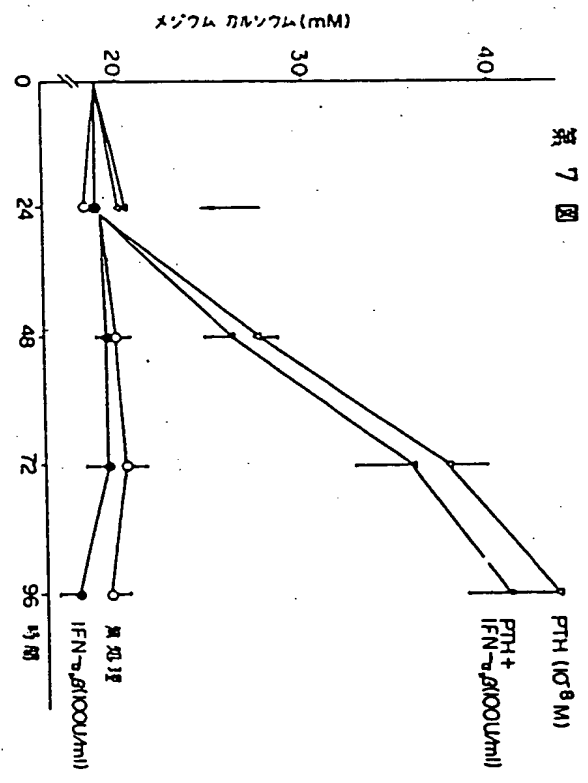
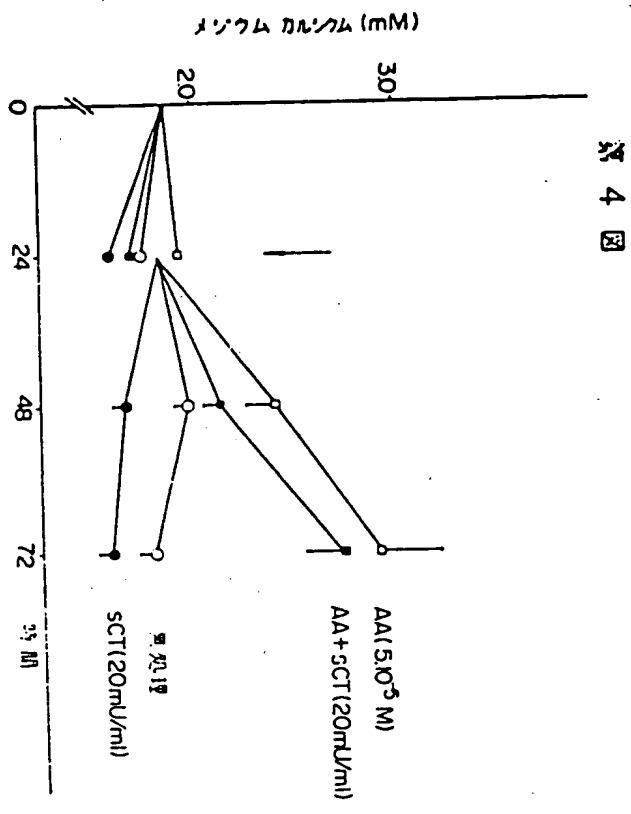
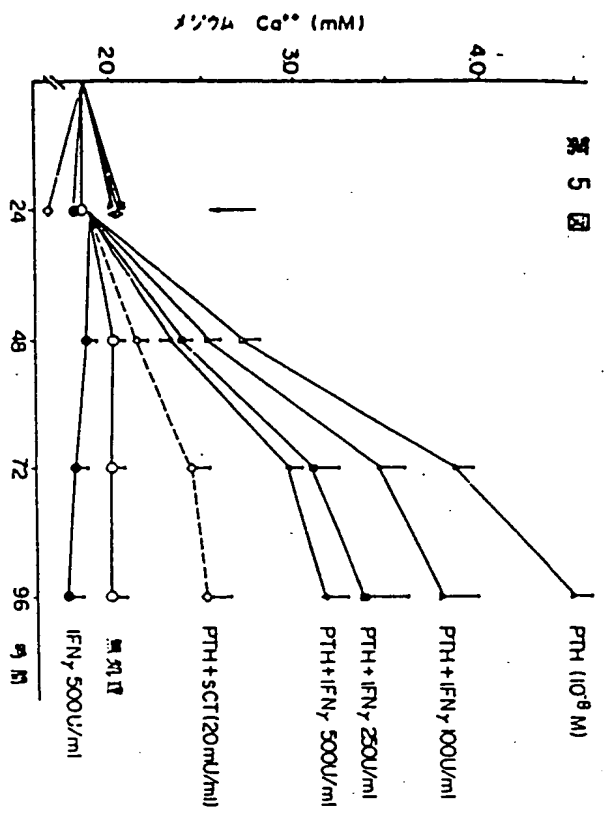
代理人 氏 姓

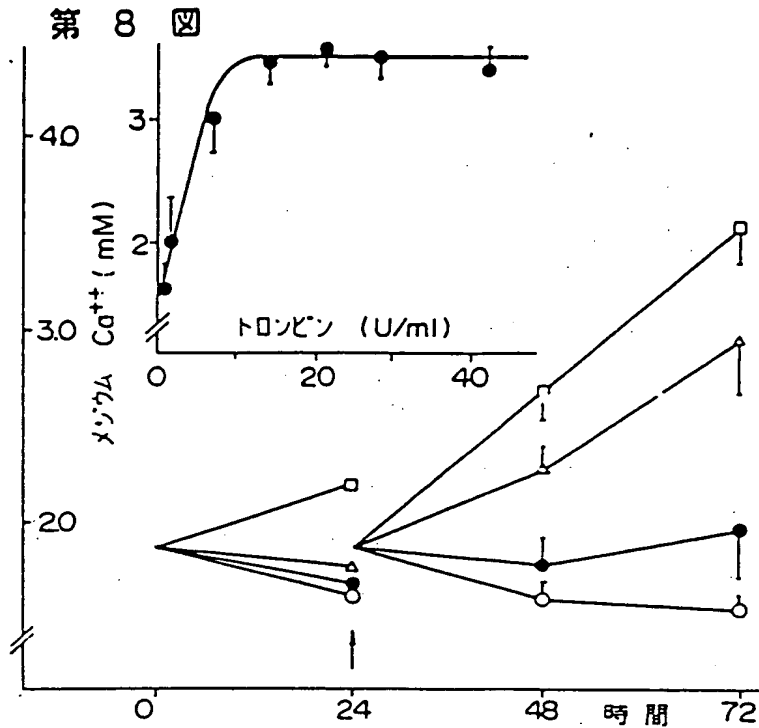
第3図



第2図







手続補正書(方式)

昭和61年8月//日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許第123862号

2. 発明の名称

I P M - P 含有医薬組成物

3. 補正をする者

出許との関係 特許出願人

住所 所 ベーリンガー・インゲルハイム・インターナショナル
 (名称) デゼルシヤフト・ミット・ベシユレングナル
 ハラツク

4. 代理人

住所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
 新大手町ビルディング331
 電話 (211) 3651 (代表)
 氏名 (6669) 浅村 昭

5. 補正命令の日付

昭和61年7月29日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書

8. 補正の内容

別紙のとおり

明細書の序言(内容に変更なし)

